

Ю. В. ШЕЛУДЬКО, И. А. КОСТЕНЮК

ДИНАМИКА РОСТА И СОДЕРЖАНИЕ СУММЫ АЛКАЛОИДОВ В ТРАНСГЕННОЙ КОРНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ (*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH.)

Получена и отселектирована трансгенная корневая культура «hairy roots» раувольфии змеиной. Изучалось влияние некоторых физических факторов на прирост биомассы в культуре. Обнаружена положительная корреляционная связь между величиной объема питательной среды и уровнем прироста биомассы. Исследовано содержание внутриклеточных индольных алкалоидов группы аймалина и показано, что его значение превышает таковое для листьев и корней интактного растения.

Введение. Трансгенные корневые культуры «hairy roots» представляют интерес не только в качестве объектов биотехнологии, перспективных с точки зрения использования их для синтеза ценных веществ, но и как модельные экспериментальные системы для изучения физиологии растений и, в частности, процессов вторичного метаболизма. Этот интерес обусловлен рядом свойств, присущих культуре «hairy roots»: с одной стороны — относительно высокой скоростью роста, характерной для онкогенных клеток, с другой — у «бородатых корней» отмечается уровень вторичного метаболизма, сходный с таковым у интактного растения, и генетическая стабильность, что выгодно отличает их от культур недифференцированных клеток [1]. В ряде работ, посвященных изучению содержания алкалоидов в культурах «hairy roots» растений различных видов и семейств, отмечается интенсивность синтеза и накопление этих метаболитов, зачастую не ниже уровня синтеза и накопления алкалоидов в каллусной культуре соответствующего вида, культуре нетрансформированных корней или в интактном растении [1, 2].

В настоящей работе приводятся данные о получении трансгенной корневой культуры «hairy roots» раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) — ценного продуцента обширной группы индольных алкалоидов, а также о результатах анализа содержания алкалоидов в ткани и динамике роста культуры.

Материалы и методы. Трансформацию проводили методом кокультивирования: 6—7 листовых дисков помещали в 50 мл суспензии агробактерий и инкубировали 4—5 ч при температуре 25 °С. Для стимулирования *vir*-системы агробактерий в среду был добавлен ванилин в концентрации 500 мкМ [3]. Затем, после промывания листовых дисков стерильной дистиллированной водой их помещали на агаризованную среду MS [4] без гормонов с клафораном и карбенициллином (по 200 мг/л каждого) и инкубировали в темноте при температуре 25 °С.

Отселектированная корневая культура поддерживалась на жидкой питательной среде MS без гормонов на шейкере (60 колебаний в мин) при температуре 25—27 °С в темноте. Длительность пассажа — 10—14 сут.

Для количественного определения суммарного содержания индольных алкалоидов группы аймалина в ткани проводилась экстракция по методу Воллосовича [6] в нашей модификации. К лиофильно высушенной растертой ткани (80—100 мг) добавляли хлороформ (20 мл). Доводили pH до 7,5—8,5 % -ным водным раствором аммиака. Экстрагировали в течение 5 ч на шейкере, экстракт фильтровали. Ткань повторно экстрагировали 1,5—2 объемами хлороформа. После этого экстракт упаривали под вакуумом, а осадок растворяли в 1—2 мл хлороформа, переносили в пробирку и упаривали на воздухе без доступа света, вносили концентрированную азотную кислоту (65—68 %). Фотометрировали на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром

($\lambda = 520$ нм), содержание алкалоидов в растворе определяли по абсорбционному графику, построенному для аймалина.

Качественный анализ внутриклеточных алкалоидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» (ЧСФР). Из ткани алкалоиды экстрагировали по методу Парра и соавт. [7] в нашей модификации. Разделение проводили в системе бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:1).

Результаты исследований и их обсуждение. Нами была проведена трансформация стерильных листовых дисков раувольфии змеинной штаммом *Agrobacterium rhizogenes* A4, содержащим бинарную векторную систему, включающую в качестве *vir*-хелпера дикую Ri-плазмиду.

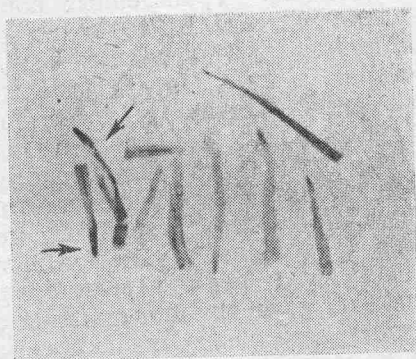
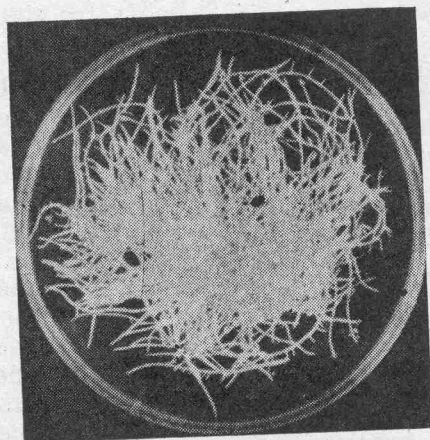


Рис. 1. Трансгенная культура «hairy root» раувольфии змеинной

Рис. 2. Специфическое окрашивание трансгенных корней (указаны стрелками) на среде, содержащей 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронид, при гистохимическом анализе экспрессии гена β -глюкуронидазы

В бинарном векторе представлены маркерные ген устойчивости к канамицину растений под *pos*-промотором и ген β -глюкуронидазы под 35S-промотором. В плазмиде также присутствует бактериальный ген устойчивости к канамицину.

На 20—23-е сутки после инокуляции была получена культура «бородатых корней». Селекция полученных корней на среде, содержащей канамицин (200 мг/л), позволила выделить линию, устойчивую к этому антибиотику. Гистохимический анализ экспрессии гена β -глюкуронидазы показал наличие специфического синего окрашивания ткани на среде, содержащей 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронид.

Изучали влияние условий культивирования на интенсивность прироста биомассы в культуре. Обнаружена достоверная положительная корреляция (коэффициент корреляции $r_{xy} = 0,875$, $P = 0,95$) между величиной объема среды, отнесенного к единице массы культуры в начале пассажа, и показателем прироста биомассы (величина абсолютно прироста, отнесенная к исходной массе культуры). Для пяти субклонов после 4 пассажей (7 дней каждый) была отмечена достоверная отрицательная корреляция ($r_{xy} = 0,981$, $P = 0,95$) между значением исходной массы корней и величиной прироста, отнесенной к исходной массе культуры при одинаковом исходном объеме среды для всех субклонов в каждом пассаже.

Нами был проведен полный двухфакторный эксперимент с репликой [5]. В качестве переменных использовались такие параметры как отношение массы корней к объему среды в начале пассажа ($\times 1$), величина pH ($\times 2$), концентрация сахарозы в среде ($\times 3$) (табл. 1). Анализ коэффициентов регрессии уравнения показал отсутствие зависимости между концентрацией сахарозы в среде (в указанном в таблице диапазоне значений) и уровнем прироста биомассы. Полученные ко-

эффиценты свидетельствуют также о незначительном ингибирующем действии на прирост биомассы высокого значения отношения «масса корней/объем среды» в начале пассажа и высокого значения рН в выбранном диапазоне. Результаты эксперимента могут свидетельствовать о близости значений переменных в центре плана к оптимальным для роста культуры.

Исследовали содержание внутриклеточных алкалоидов группы аймалина в трансгенных корневых культурах, а также корнях и листьях интактного растения раувольфии змеиной. Результаты измерений представлены в табл. 2. Среднее значение суммарного содержания алкалоидов группы аймалина в трансгенной корневой культуре составило 135,5 мг на 100 г сухого веса (0,14 %). Содержание суммы алкалоидов в корнях и листьях интактного оранжерейного растения составило соответственно 33 и 42 мг на 100 г сухого веса (0,03 и 0,04 % соответственно).

Качественный анализ показал наличие не менее 10 фракций, флуоресцирующих в ультрафиолете (366 нм). На хроматограмме экстракта алкалоидов трансгенной корневой культуры отмечено наличие фракций, отсутствующих в пробе экстракта листьев интактного растения.

Таким образом, нами была получена трансгенная культура «hairy roots» раувольфии змеиной и изучено влияние приведенных выше физических факторов на прирост биомассы. Анализ результатов двухфакторного эксперимента с репликой позволяет сделать заключение о близости значений исследованных переменных в центре плана к оптимальным для роста культуры. Содержание внутриклеточных индольных алкалоидов группы аймалина в трансгенных корнях раувольфии змеиной превышает таковое для листьев и корней интактного растения.

Таблица 1

Основные характеристики плана полного двухфакторного эксперимента с репликой

Характеристики	m/v	рН среды	Концентрация, сахарозы, г/л
Основной уровень	0,15	6	35
Интервал варьирования	0,05	0,4	5
Верхний уровень	0,10	6,4	30
Нижний уровень	0,20	5,6	40

Примечание: m/v — значение отношения массы корней к объему среды в начале пассажа.

Таблица 2

Содержание алкалоидов группы аймалина в ткани трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной

Но- мер опыта	Сухой вес, мг	Пропус- кающая способ- ность, %	Период пассажа, сут	Содержа- ние алка- лоидов, мг в 100 г су- хого ма- териала	Но- мер опыта	Сухой вес, мг	Пропус- кающая способ- ность, %	Период пассажа, сут	Содержа- ние алка- лоидов мг в 100 г су- хого ма- териала
1	80	55	4	75,00	11	80	52	41	87,50
2	175	28	7	197,00	12	80	68	13	37,50
3	175	24	7	310,00	13	80	59	10	62,50
4	175	39	7	73,00	14	80	72	18	35,37
5	175	38	7	89,00	15	80	30	21	437,50
6	175	67	7	118,00	16	80	34	13	306,25
7	80	61	27	50,00	17	80	41	21	175,00
8	80	58	27	68,75	x_{cp}	—	—	—	135,50
9	80	37	27	225,00	S_x	—	—	—	120,73
10	80	60	41	56,25	S_{xcp}	—	—	—	29,28

Примечание. x_{cp} — среднее арифметическое; S_x — среднее квадратичное отклонение; S_{xcp} — ошибка репрезентативности [8].

РЕЗЮМЕ. Одержано та відселектовано трансгенну культуру «hairy roots» раувольфії зміної (*Rauwolfia serpentina* Benth.). Вивчався вплив фізичних факторів на приріст біомаси в культурі. Знайдено додатний кореляційний зв'язок між величиною об'єма поживного середовища та рівнем приріста біомаси. Вивчено вміст внутрішньоклітинних індольних алкалоїдів групи аймаліна та доведено, що значення його перебільшує відповідне для листя та коріння інтактної рослини.

SUMMARY. The transgenic «hairy root» culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. was obtained and selected. The effect of physical factors on the increase in biomass in the culture was studied. The positive correlation between the medium volume and the rate of the increase in biomass was detected. Ajmaline-type alkaloid intracellular content in the culture was studied. It exceeds the corresponding values for leaves and roots of the intact plant.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Signs M. W., Flores H. E. The biosynthetic potential of plant roots // Bio Essays.— 1990.— 12, N 1.— P. 7—13.
2. Садыкова Г. Д., Аханов А. У., Бурьянов Я. И. Использование генетической трансформации агробактериями для получения сверхпродуктивных линий *Solanum lacianatum* // Биотехнология.— 1991.— № 5.— С. 33—38.
3. Ashby A. M., Watson M. D., Loake G. J. et al. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants // J. Bact.— 1988.— 170, N 9.— P. 4181—4187.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phys. Plant.— 1962.— 5, N 13.— P. 473—497.
5. Саутин С. Н. Планирование эксперимента в химии и химической технологии.— Л.: Химия, 1975.— 48 с.
6. Волосович А. Г., Никлаева Л. А., Позняков Н. К. и др. Метод количественного определения алкалоидов группы индолина // Растит. ресурсы.— 1977.— 13, № 1.— С. 127—132.
7. Parr A. J., Peerless A. C. J., Hamill J. D. et al. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus* // Plant Cell Reports.— 1988.— 7, N 5.— P. 309—312.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия.— М.: Высш. шк., 1980.— 293 с.

Ин-т клет. биологии и генет. инженерии НАН Украины, Киев

Поступила 25.03.93

УДК [576.3:581.4]:58.091:633.2

М. К. ПАВЛОВА, Б. З. ПИЛИПЧУК, О. Е. ШВЕДОВА

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЙГРАСО-ОВСЯНИЧНЫХ ГИБРИДОВ

Изучены условия получения морфогенных каллусов, сохраняющих регенерационный потенциал на протяжении 18 мес, из гибридов райграсса. Получены соматоклональные формы райграссо-овсяничных гибридов от восьми комбинаций скрещивания, исходным эксплантатом для которых были гибридные зародыши в возрасте 2—3 нед. после опыления. Изучены цитологические и морфологические особенности растений-регенерантов, в результате чего выделены перспективные формы для проведения дальнейшей селекционной работы.

Введение. В последние годы возрос интерес к изменчивости растений, полученных в культуре *in vitro*, а само явление получило название «соматоклональной вариабельности» [1]. Не обсуждая механизмы, вызывающие соматоклональную изменчивость, отметим, что с практической точки зрения это явление рассматривается как потенциально новый источник появления форм растений, обладающих ценными свойствами, часть которых передается по наследству. В настоящее время у злаковых культур получены соматоклоны, характеризующиеся хозяйственно полезными признаками и имеющие практическое значение [2,

© М. К. ПАВЛОВА, Б. З. ПИЛИПЧУК, О. Е. ШВЕДОВА, 1994

ISSN 0564—3783. ЦИТОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА. 1994. Т. 28. № 4